

Etat actuel de la culture *in vitro* chez le genre *Gossypium*

D. Frydrych

I.R.C.T.-C.I.R.A.D., B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex, France.

RÉSUMÉ

L'application des techniques de la culture *in vitro* aux espèces de *Gossypium* accuse un certain retard par rapport à d'autres plantes tropicales cultivées. Cependant, les recherches au plan mondial ont abouti récemment à des résultats marquants dans les domaines suivants : 1) les haploïdes, 2) les hybrides interspécifiques, 3) les embryons somatiques, 4) les protoplastes.

Quelques haploïdes de *G. hirsutum* ont été obtenus par androgénèse ; cependant, le rendement est encore très faible. Dans le

domaine le plus avancé des hybridations interspécifiques, des croisements ont été réalisés *in vitro* entre espèces cultivées tétraploïdes et espèces sauvages diploïdes. En outre, quelques embryons somatiques de *G. klotzschianum* ou de *G. hirsutum* ont été produits ; mais, dans la plupart des cas, les plantes ne se développent pas. En ce qui concerne les protoplastes, des divisions et des colonies cellulaires ont été observées ; des fusions entre protoplastes de deux espèces ont été réalisées.

MOTS CLÉS : culture *in vitro*, *Gossypium*, références, haploïdes, hybrides interspécifiques, embryons somatiques, protoplastes.

INTRODUCTION

Le but du présent article est de faire le point sur l'état des connaissances relatives à la culture *in vitro* chez le genre *Gossypium*, dans les domaines suivants :

1) les haploïdes, 2) les hybrides interspécifiques, 3) les embryons somatiques, 4) les protoplastes.

Pour chacun des quatre thèmes seront exposés les objectifs poursuivis par les chercheurs, puis l'historique des travaux au niveau mondial.

I. LES HAPLOÏDES

Les haplodiploïdes de cotonniers (haploïdes dont le stock chromosomique a été doublé) pourraient être utilisés à deux finalités : l'une au plan pratique et l'autre au niveau fondamental.

a) Le premier objectif est la création de lignées variétales homozygotes en une génération, dès la F₁ ; appliquée aux espèces cultivées allotétraploïdes (avec 52 chromosomes), cette méthode permettrait un gain de temps de plusieurs générations par rapport aux voies de sélection classique.

b) Le second objectif est l'apport d'informations complémentaires sur les génomes du complexe d'espèces du genre *Gossypium*.

En l'état actuel, les haploïdes sont obtenus soit spontanément (polyembryonnie et semigamie), soit par des techniques artificielles d'induction, destinées à empêcher la fécondation et à produire des embryons parthénogénétiques. On peut espérer un rendement plus élevé en opérant dans des conditions contrôlées en culture *in vitro*.

Androgénèse (par culture d'anthères ou de microspores)

Des cals ont été produits à partir d'anthères de *Gossypium* tétraploïdes (CATELAND, 1974 ; COGNET et FRYDRYCH, 1976 ; BARROW *et al.*, 1978 ; BALUCH, 1979) et même,

dans un cas, à partir de microspores. Des suspensions de cellules haploïdes (avec 26 chromosomes) ont été réalisées (BARROW *et al.*, 1978). Récemment, des proembryoïdes ont été obtenus (HSI et WU, 1981) et même des plantules haploïdes (REFAAT, 1984).

Les rendements sont encore faibles : sur 100 anthères, 35 environ produisent des cals (HSI et WU, 1981).

Gynogénèse (par culture d'ovules non fécondés)

Elle a d'abord été entreprise par BEASLEY, en 1973, pour l'étude en culture *in vitro* des ovules non fécondés et de leurs fibres.

Ensuite, elle a été utilisée dans le but de produire des haploïdes :

- en 1976 (HSU et STEWART), des cals ont été obtenus à partir d'ovules non fécondés ;
- en 1982, (BAO et WU), des bourgeons verts ont été néoformés sur les cals ;
- en 1984 (PALLARES), des néoformations et des embryoïdes ont été observés.

Cependant, jusqu'ici, la présence d'haploïdes n'a pas pu être mise en évidence et les embryoïdes ne se sont pas développés en plantules.

II. LES HYBRIDES INTERSPÉCIFIQUES (CULTURE D'EMBRYONS ⁽¹⁾ OU D'OVULES FÉCONDÉS ⁽²⁾)

La création d'hybrides interspécifiques entre les cultivars tétraploïdes (avec 52 chromosomes) et les *Gossypium* sauvages diploïdes (avec 26 chromosomes) est recherchée pour l'amélioration de divers caractères des cotonniers cultivés. Dans les conditions naturelles, certaines hybridations n'aboutissent pas. La culture *in vitro* peut permettre de surmonter les échecs dus à l'incompatibilité entre l'embryon et son tissu nourricier (albumen), comme c'est le cas dans les croisements *G. hirsutum* × *G. arboreum*.

Pour le genre *Gossypium*, les hybridations sont l'un des plus anciens thèmes de recherche pour lequel la culture *in vitro* ait été utilisée. Cette technique est particulièrement intéressante pour l'obtention d'hybrides inaccessibles par les voies classiques.

Dès 1950, les premiers auteurs ont tenté de cultiver *in vitro* des embryons isolés. Ce fut un échec pour les embryons excisés moins de 15 jours après l'anthèse ; l'embryon devait avoir dépassé le stade globulaire et atteint le stade cœur (donc avoir commencé sa différenciation).

A partir de 1960 (JOSHI), non plus les embryons mais les ovules prélevés à J₅ ⁽³⁾ furent cultivés *in vitro*. Avec la

mise au point de milieux adéquats, les ovules ont été séparés de la plante-mère de plus en plus tôt après la fécondation : à J₂ (BEASLEY et TING, 1971). Cependant, pour un prélèvement juste après l'anthèse, le taux d'embryons formés ultérieurement restait faible : 20 % et 40 %, respectivement à J₂ et J₃ (DEMBELE, 1981).

Si pour les ovules autofécondés, le pourcentage d'embryons viables augmente avec le temps écoulé entre l'anthèse et l'excision, il en va différemment des ovules contenant des hybrides interspécifiques ; ce laps de temps doit être raccourci au maximum pour augmenter les chances de survie de l'embryon.

En 1978, deux équipes, l'une américaine (STEWART et HSU) et l'autre chinoise (LIANG *et al.*), ont réalisé simultanément des hybridations interspécifiques, notamment entre espèces tétraploïdes et diploïdes. Ces chercheurs procédaient à une pollinisation et fertilisation *in situ* (en maintenant les capsules avec des vaporisations d'hormones : acide gibbérélique et acide naphthalène acétique), puis excisaient et cultivaient les embryons *in vitro*, où leur développement se poursuivait. Selon le croisement, les taux de viabilité de la F₁ étaient de 46 à 100 % et les taux de germination des embryons étaient normaux (LIANG *et al.*, 1978).

III. NÉOFORMATIONS, EMBRYONS SOMATIQUES À PARTIR DE CALS OU DE SUSPENSIONS CELLULAIRES

Sur le plan pratique, l'embryogenèse somatique réalisée à partir de plantes matures permettrait le clonage, d'une part, et des manipulations génétiques sur des plantes sélectionnées pour des caractères intéressants, d'autre part.

Ce domaine a été fréquemment exploré, surtout par les auteurs américains. Les étapes marquantes ont été : 1) la production de cals en 1971 ; 2) puis des néoformations de méristèmes aléatoires et rares ; 3) la réalisation de suspensions cellulaires en 1974 et 4) l'embryogenèse somatique en 1979, avec l'obtention de quelques plantes en serre en 1983.

Jusqu'en 1984, les cals et suspensions cellulaires ont été produits à partir de tissus de jeunes plantes : cotylédons, mais surtout hypocotyles d'espèces diploïdes et tétraploïdes. Des obstacles ont dû être surmontés : lenteur de croissance et brunissement des cals, dus aux polyphénols. Pour pallier ces inconvénients, des antioxydants ont été introduits dans le milieu (tels l'acide isoascorbique, le dithioérythritol), ainsi qu'une auxine en concentration élevée (17 mg/l d'A.N.A.). En 1977, à partir de 6 espèces de *Gossypium*, PRICE *et al.* obtiennent des cals verts et vigoureux sur un milieu défini (de MURASHIGE et SKOOG, 1962), additionné de glucose et sous fort éclaircissement (8 000-9 000 lux).

De rares néoformations de bourgeons ont été produites

de façon aléatoire (en 1977, KATTERMAN *et al.* ; SMITH *et al.*).

Les suspensions cellulaires ont été obtenues avec des cals friables d'hypocotyles (DAVIS *et al.*, 1974) ou d'ovules (STEWART et HSU, 1977-1978 ; STEWART, 1978). En 1979, l'embryogenèse somatique a été réalisée (PRICE et SMITH) dans des suspensions cellulaires, à partir d'hypocotyles de *G. klotzschianum* (2n). Ces auteurs montraient le rôle essentiel de certaines composantes du milieu : 1) d'une cytokinine (10 mg/l d'isopentenyladénine), lors de l'induction du cal ; 2) d'un acide aminé (glutamine ou asparagine), pour le déclenchement de l'embryogenèse. Mais l'élongation de la tige et le développement en plante ne se faisaient pas.

En 1983, DAVIDONIS et HAMILTON obtiennent des plantes par embryogenèse somatique, sur des cals de cotylédons de *G. hirsutum* (4n). Il a fallu environ 15 mois entre la mise en culture des tissus et la sortie des plantules. Pour la croissance de ces embryons, les auteurs ont montré le rôle bénéfique de l'acide gibbérélique et de l'azote (sous forme de nitrate uniquement).

En 3 mois à partir de l'explantat initial, FINER et SMITH (1984) ont observé des embryons somatiques dans des suspensions cellulaires obtenues à partir des plantes matures de *G. klotzschianum* (2n). Mais ces embryons ne se développaient pas et présentaient des tiges et feuilles anormales.

IV. LES PROTOPLASTES

Les protoplastes offrent des perspectives d'applications nombreuses et considérables avec la création d'hybrides somatiques et l'introduction de caractéristiques intéressantes par le génie génétique. L'accès à l'ensemble des génomes du genre serait ainsi possible et la voie des protoplastes serait complémentaire de l'hybridation interspécifique.

Les premières cultures de protoplastes de *G. hirsutum* ont été réalisées aux Etats-Unis (BEASLEY *et al.*, 1974). En 1977, BHOSWANI *et al.* ont observé des divisions de protoplastes, lorsque la température était supérieure à 25 °C et

en présence de nitrate d'ammonium et de chlorure de calcium dans le milieu. En outre, l'influence de l'âge du cal sur le rendement en protoplastes a été définie (âge optimal : 6-9 jours).

Des auteurs russes ont produit des colonies cellulaires par division des protoplastes (KHASANOV et BUTENKO, 1979). Ensuite, d'autres chercheurs (BRIGASHEV *et al.*, 1982) ont fait fusionner des protoplastes de *G. hirsutum* et *G. barbadense*.

(1) Embryon cultivé isolé.

(2) Embryon cultivé dans l'ovule.

(3) J₅ : sixième jour après l'anthèse.

CONCLUSIONS

La situation peut être résumée de la façon suivante :

— Pour l'obtention d'haploïdes.

a) par androgenèse, quelques plantes haploïdes ont été produites en 1984 (REFAAT) ; mais, le rendement est encore trop faible pour permettre la sélection de plantes intéressantes ;

b) par gynogenèse (à partir d'ovules non fécondés), des néoformations et des embryoides ont été produits (BAO et WU, 1982 ; PALLARES, 1984) ; cependant, la présence d'haploïdes n'a pas été démontrée.

— Dans le domaine le plus avancé des hybridations interspécifiques, des croisements ont été réalisés *in vitro* en 1978 entre espèces cultivées tétraploïdes et sauvages diploïdes (équipes de STEWART, de LIANG).

— Des embryons somatiques ont été produits à partir de *G. klotzschianum* (STEWART *et al.*, 1979) et de *G. hirsutum* (DAVIDONIS et HAMILTON, 1983) ; cependant, le rendement en embryons reste faible et, dans la plupart des cas, le développement en plantules ne se fait pas.

— En ce qui concerne les protoplastes, des divisions et des colonies cellulaires ont été observées (KHASANOV et BUTENKO, 1979) et des fusions entre protoplastes de deux espèces ont été réalisées (ERGASHEV *et al.*, 1982).

Depuis la dernière décennie, un nombre croissant de chercheurs pratiquent la culture *in vitro* à partir d'espèces de *Gossypium*. Si les recherches continuent à progresser à la vitesse actuelle, la culture *in vitro* devrait occuper prochainement une place de choix pour l'amélioration des cotonniers.

REMERCIEMENTS

A Monsieur SCHWENDIMAN pour la lecture du manuscrit et pour les conseils de présentation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BALUCH (Z. A. M.), 1979. — *In vitro* anther culture of *Gossypium* species. *Pakistan Cott.*, 23, 2, 161-163.
- BOA (W. Z.), WU (J.-Y.), 1982. — Study on induction and differentiation of green buds from *in vitro* culture of unfertilized cotton ovule. *Jiangsu Agric. Sci.*, 11, 21-23, 43.
- BARROW (J.), KATTERMAN (F.), WILLIAMS (D.), 1978. — Haploid and diploid callus from cotton anthers. *Crop Sci.*, 18, 619-622.
- BEASLEY (C. A.), TING (I. P.), 1971. — Axenic culture of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) ovules. *Amer. J. Bot.*, 58, 5, 475.
- BEASLEY (C. A.), 1973. — Hormonal regulation of growth in unfertilized cotton ovules. *Science, Wash.*, 179, 1003-1005.
- BEASLEY (C. A.), TING (I. P.), LINKINS (A. E.), BIRNBAUM (E. H.), DELMER (D. P.), 1974. — Cotton ovule culture : a review of progress and a preview of potential. In : STREET (H. E.) (ed.), *Tissue culture and plant science*, 1974. Academic Press, N.Y.
- BHOJWANI (S. S.), POWER (J. B.), COCKING (E. C.), 1977. — Isolation culture and division of cotton callus protoplast. *Plant. Sci. Lett.*, 8, 1, 85-89.
- CATELAND (B.), 1974. — Culture *in vitro* d'anthers de cotonnier. Rapport d'activité pour l'année 1974, 34 p.
- COGNEE (M.), FRYDRYCH (D.), 1976. — Recherche d'haploïdes de cotonniers *in vitro*. *Compte-rendu d'activité I.R.C.T.*, Montpellier, 4, non publié.
- DAVIDONIS (G. H.), HAMILTON (R. H.), 1983. — Plant regeneration from callus tissue of *Gossypium hirsutum* L. (Cotton). *Plant Sci. Lett.*, 32, 1/2, 89-93.
- DAVIS (D. G.), DUSBABEK (K. E.), HOERLUF (R. A.), 1974. — *In vitro* culture of callus tissue and cell suspensions from okra (*Hibiscus esculentus* L.) and cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *In vitro* (Rockville), 9, 395-398.
- DEMBELE (S.), 1981. — La culture *in vitro* d'ovules fécondés de coton (*Gossypium hirsutum*). D.E.A., U.S.T.L. et E.N.S.A.M. Acad. Montpellier, 47 p.
- ERGASHEV (A. K.), KHAKIMOV (R. A.), SAIFIDDINOV (R. F.), 1982. — Isolation of marked protoplasts of *Gossypium barbadense* L. and *G. hirsutum* L. and the induction of their fusion. *Dokl. Ak. Uzb. S.S.R.*, 12, 36-38.
- FINER (J. J.), SMITH (R. H.), 1984. — Initiation of callus and somatic embryos from explants of mature cotton (*Gossypium klotzschianum* Anders.). *Plant Cell Rep.*, 3, 1, 41-43.
- HSI (Y. L.), WU (K. I.), 1981. — Callus formation induced from the anther culture of Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). (Abstr.). *Proceed. Symposium on plant tissue culture*, 239-240.
- HSU (C. L.), STEWART (J. D. Mc.), 1976. — Callus induction by (2-chloroethyl) phosphonic acid on cultivated cotton ovules. *Physiol. Plant.*, 36, 150-153.
- HSU (C. L.), STEWART (J. McD.), 1979. — Initiation of ovular callus and growth of cells in suspension of *G. arboreum* L. *Beltwide Cott. Prod. Res. Conf.*, Phoenix, Arizona, 34.
- JOSHI (P. C.), 1960. — *In vitro* growth of cotton ovules. In « Plant embryology » a Symposium (11-14 nov.), *Council scientific and industrial Res.*, New Delhi, India, 199-204. Sangam Press Private-Ltd.
- KATTERMAN (F. R. H.), WILLIAMS (M. D.), CLAY (W. F.), 1977. — The influence of a strong reducing agent upon the initiation of callus from the germinating seedlings of *Gossypium barbadense*. *Physiol. Plant.*, 40, 98-100.
- KHASANOV (M. M.), BUTENKO (R. G.), 1979. — Isolated protoplast culture from cotyledons of cotton *Gossypium hirsutum* (russ. anglais) *Fiziol. Rast., Moskva*, 26, 1, 103-108.
- LIANG (Z. L.), SUN (C. W.), LIU (D. L.), JIANG (R. Q.), 1978. Results of experiments on interspecific incompatibility and F1 sterility in cotton. *Acta Genetica Sinica*, 5, 3, 171-180.
- MURASHIGE (T.), SKOOG (F.), 1962. — A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- PRICE (H. J.), SMITH (R. H.), GRUMBLES (R. M.), 1977. — Callus cultures of six species of cotton (*Gossypium* L.) on defined media. *Plant Sci. Lett.*, 10, 115-119.
- PRICE (H. J.), SMITH (R. H.), 1979. — Somatic embryogenesis in suspension cultures of *Gossypium klotzschianum* Anders. *Planta*, 145, 305-307.
- PALLARES (P.), 1984. — Culture *in vitro* d'ovules fécondés et non fécondés de cotonnier. D.E.S., U.S.T.L., 67 p.
- REFAAT (M.), 1984. — Communication personnelle.

- SMITH (R. H.), PRICE (H. J.), THAXTON (J. B.), 1977. — Defined conditions for the initiation and growth of cotton callus *in vitro*. I. *Gossypium arboreum*. *In vitro*, 13, 329-334.
- STEWART (J. McD.), HSU (C. L.), 1977. — *In ovulo* embryo culture and seedling development of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Planta*, 137, 113-117.
- STEWART (J. M.), HSU (C. L.), 1978. — Hybridization of diploid and tetraploid cottons through *in ovulo* culture. *J. Heredity*, 69, 404-408.
- STEWART (J. McD.), 1978. — Ammonium and Ag⁺ influence ethephon induced callus on cotton ovules. *Beitwide Cott. Prod. Res. Conf. Dallas, Texas*, p. 39.

Present state of *in vitro* culture of *Gossypium* species

D. Frydrych

I.R.C.T.-C.I.R.A.D., B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex, France.

SUMMARY

The application of *in vitro* culture techniques is somewhat late for *Gossypium* species as compared with other cultivated tropical crops. However, researches carried out on a world-wide level have given recently major results in the following fields : 1. haploids, 2. interspecific hybrids, 3. somatic embryos, 4. protoplasts.

Some *G. hirsutum* haploids have been obtained by androgenesis but yields are still very low. Regarding interspecific hybridization,

which is the most advanced field, *in vitro* crosses have been obtained between tetraploid cultivated species and diploid wild species. Somatic embryos of *G. klotzschianum* and *G. hirsutum* have also been obtained but, in most cases, they do not develop into plantlets. As far as protoplasts are concerned, divisions and cell colonies have been observed ; fusions of protoplasts from two species have also been achieved.

KEY WORDS : *in vitro* culture, *Gossypium*, references, haploids, interspecific hybrids, somatic embryos, protoplasts

INTRODUCTION

This paper aims at reviewing the information known on *in vitro* culture of *Gossypium* species in the following fields : 1. haploids, 2. interspecific hybrids, 3. somatic embryos, 4. protoplasts.

The objectives sought by scientists together with a survey of the works carried out on a world-wide level will be presented for each topic.

I. HAPLOIDS

Cotton haplodiploids (haploids with a doubled chromosome number) could be used for two purposes : a practical and a fundamental one.

a) The first objective is to create homozygote varietal lines into one generation, starting from F₁ ; applied to allotetraploid (with 52 chromosomes) cultivated species, this method would save several generations as compared with conventional breeding techniques.

b) The second objective is to bring additional information on the genomes of the complex of *Gossypium* species.

Haploids are currently obtained either spontaneously (polyembryony and semigamy) or through artificial induction techniques, meant to prevent fertilization and produce parthenogenetic embryos. Higher yields are expected from *in vitro* culture.

Androgenesis (by anther or microspore culture)

Calluses have been produced from tetraploid *Gossypium* anthers (CATELAND, 1974 ; COGNET and FRYDRYCH, 1976 ;

BARROW *et al.*, 1978 ; BALUCH, 1979) and even, in one case, from microspores. Suspensions of haploid cells (with 26 chromosomes) have been achieved (BARROW *et al.*, 1978).

Proembryoids (HSI and WU, 1981) and even haploid plantlets (REFAAT, 1984) have recently been obtained.

Yields are still low : only about 35 anthers out of 100 induce calluses (HSI and WU, 1981).

Gynogenesis (by unfertilized ovule culture)

This was first carried out by BEASLEY in 1973 to examine unfertilized ovules and their fibers during *in vitro* culture. It was afterwards used to produce haploids : — in 1976 (HSU and STEWART), calluses have been produced from unfertilized ovules, — in 1982 (BAO and WU), green buds

have been neoformed on calluses, — in 1984 (PALLARES) neoformations and embryoids have been observed. How-

ever, the presence of haploids has not been shown so far and embryoids have not developed into plantlets.

II. INTERSPECIFIC HYBRIDS (EMBRYO ⁽¹⁾ OR FERTILIZED OVULE ⁽²⁾ CULTURE)

Creating interspecific hybrids between tetraploid cultivars (with 52 chromosomes) and diploid wild *Gossypium* (with 26 chromosomes) is desired to improve various characters in cultivated cottons. Under natural conditions, some hybridizations do not succeed. Thanks to *in vitro* culture, it is possible to overcome the failures due to incompatible embryo and nutrient tissue (albumen) as happens in *G. hirsutum* × *G. arboreum* crosses. In *Gossypium* species, hybridization is one of the oldest research themes for which *in vitro* culture was used. This technique is particularly interesting to obtain hybrids inaccessible by conventional ways.

As long ago as 1950, the first authors tried to cultivate *in vitro* isolated embryos. It failed for those excised 15 days after anthesis. The embryos must have been beyond the globular stage, in the heart stage (differentiation was therefore started). As from 1960 (JOSHU), ovules were taken on D6⁽³⁾ and cultivated *in vitro*. As adequate media were developed, ovules were separated from mother plants, sooner and sooner after fertilization : on D2 (BEASLEY and

TING, 1971). However, when samples were taken just after anthesis, the percentage of embryos formed later was low : 20 % and 40 % on D2 and D3 respectively (DEMBELE, 1981).

While the percentage of viable embryos increases with the period of time between anthesis and excision for self-fertilized ovules, the same does not apply to ovules containing interspecific hybrids ; this lapse of time must be as short as possible for the embryo to have greater chances of surviving.

In 1978, American (STEWART and HSU) and Chinese (LIANG *et al.*) scientists simultaneously achieved interspecific hybridizations, particularly between tetraploid and diploid species. They carried out *in situ* fertilization (maintaining the bolls with hormone spraying : gibberellic acid and acetic naphthalene acid), excised and cultivated *in vitro* the embryos which went on developing. Depending on the cross, the viability rates of F₁ were 46 to 100 % and the embryo germination rates were normal (LIANG *et al.*, 1978).

III. NEOFORMATIONS, SOMATIC EMBRYOS FROM CALLUSES OR CELL SUSPENSIONS

Somatic embryogenesis achieved with mature plants would be a useful way of cloning. Moreover, genetic experiments on plants selected for desirable characters would be feasible. This field has often been explored, especially by American authors. There have been major steps : 1) production of calluses in 1971, 2) rare and random meristem neoformations, 3) cell suspensions obtained in 1974, 4) somatic embryogenesis achieved in 1979, with several plants obtained in the glasshouse in 1983.

Until 1984, calluses and cell suspensions were produced from tissues of young plants : cotyledons, but especially hypocotyls from diploid and tetraploid species. Obstacles have been overcome : slow growth and darkening of calluses due to polyphenols. In order to offset these deficiencies, antioxidant agents have been introduced in the medium (isoascorbic acid, dithioerythritol), as well as an auxin at a high concentrations (17 mg/l of ANA). In 1977, with 6 *Gossypium* species, PRICE *et al.* obtained green and vigorous calluses on a defined medium (according to MURASHIGE and SKOOG, 1962), with glucose added and strong light (8,000-9,000 lux). Rare bud neoformations have been randomly produced (in 1977, KATTERMAN *et al.* ; SMITH *et al.*).

Cell suspensions have been obtained with friable calluses from hypocotyls (DAVIS *et al.*, 1974) or ovules (STEWART and HSU, 1977-1978 ; STEWART, 1978). In 1979, somatic embryogenesis was achieved (PRICE and SMITH) in cell suspensions, from hypocotyls of *G. klotzschianum* (2n). These authors showed the essential incidence of some components of the medium : 1) one cytokinin (10 mg/l isopentenyladenin), during callus induction ; 2) one amino-acid (glutamine or asparagine), to initiate embryogenesis ; but stem elongation and development into plants did not occur.

In 1983, DAVIDONIS and HAMILTON obtained plants by somatic embryogenesis, on calluses from cotyledons of *G. hirsutum* (4n). About 15 months elapsed between the beginning of tissue culture and plantlet growth. The authors have shown the beneficial incidence of gibberellic acid and nitrogen (in nitrate form only) on the growth of these embryos.

Three months after the initial explant, FINER and SMITH (1984) have observed somatic embryos in cell suspensions obtained from mature plants of *G. klotzschianum* (2n). But these embryos did not develop and had abnormal stems and leaves.

IV. PROTOPLASTS

The prospects of application offered by protoplasts are numerous and considerable with the creation of somatic hybrids and introduction of desirable characteristics through genetic engineering. All the genomes of the genus would be accessible and protoplasts would be complementary to interspecific hybridization. Protoplasts from *G. hirsutum* were first cultivated in the United States (BEASLEY *et al.*, 1974). In 1977, BHOSWANI *et al.* observed

protoplast divisions, when temperature was over 25 °C and when ammonium nitrate and calcium chloride were used in the medium. Besides, the incidence of callus age on protoplast yield was defined (optimal age : 6-9 days).

Russian authors have produced cell colonies by protoplast divisions (KHASANOV and BUTENKO, 1979). Later, other scientists (ERGASHEV *et al.*, 1982) have made protoplasts from *G. hirsutum* and *G. barbadense* fuse.

(1) Embryo cultivated separately.

(2) Embryo cultivated inside the ovule.

(3) D6 : sixth day after anthesis.

CONCLUSIONS

The situation may be summed up as follows :

— Haploids

a) by androgenesis : a few haploid plants have been produced in 1984 (REFAAT) ; but yields are still too low to make selection of desirable plants possible ;

b) by gynogenesis (from unfertilized ovules) : neoformations and embryoids have been produced (BAO and WU, 1982 ; PALLARES, 1984) ; however, the presence of haploids has not been demonstrated.

— As far as interspecific hybridization is concerned, *in vitro* crosses have been obtained in 1978, between tetraploid cultivated and diploid wild species (STEWART *et al.*, LIANG *et al.*).

— Somatic embryos have been produced from *G. klotzschianum* (STEWART *et al.*, 1979) and *G. hirsutum* (DAVIDONIS and HAMILTON, 1983) ; however, the yield of embryos is low and most often they do not develop into plants.

— As far as protoplasts are concerned, divisions and cell colonies have been observed (KHASANOV and BUTENKO, 1979) and protoplasts of two different species have been fused (ERGASHEV *et al.*, 1982).

An increasing number of scientists have been practising *in vitro* culture from *Gossypium* species since the last decade. Provided researches continue to progress as quickly as they do today, *in vitro* culture should be in a top position for cotton breeding in the near future.

ACKNOWLEDGEMENT

Thanks are extended to M. SCHWENDIMAN who read the paper and made valuable suggestions on its presentation.

RESUMEN

Para las especies de *Gossypium*, la aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* tiene retraso en comparación con otras plantas tropicales cultivadas. Sin embargo, las investigaciones a nivel mundial han desembocado recientemente en resultados notables en los sectores siguientes : 1. haploides, 2. híbridos interespecíficos, 3. embriones somáticos, 4. protoplastas.

Algunos haploides de *G. hirsutum* han sido obtenidos por androgénesis ; sin embargo, el rendimiento es todavía muy

reducido. En el sector más avanzado de las hibridaciones interespecíficas, cruzamientos han sido realizados *in vitro* entre especies cultivadas tetraploides y especies salvajes diploides. Además, algunos embriones somáticos de *G. klotzschianum* o *G. hirsutum* han sido producidos ; pero, en la mayoría de los casos, el desarrollo en plantas no ocurre. Por lo que se refiere a protoplastas, divisiones y colonias celulares han sido observadas ; fusiones entre protoplastas de dos especies han sido realizadas.